

foi realizado o treinamento para as análises de ELISA e imunodifusão, e em seguida quatro pesquisadores, foram treinados na Universidade da Geórgia. Uma pesquisadora recebeu o treinamento para o diagnóstico anatomopatológico, que busca a identificação da inclusão viral eosinofílica no núcleo das células epiteliais da mucosa conjuntiva e do trato respiratório, sendo essa lesão patognomônica em aves enfermas no estágio inicial da doença (cinco a sete dias após a infecção). Os trabalhos de biologia molecular foram executados segundo o diagnóstico da LTI pela PCR convencional e em tempo real, tendo em vista que são provas rápidas, específicas e sensíveis. Toda a base teórica da PCR foi recordada e com as amostras de raspado de traqueia de aves enfermas, realizou-se um protocolo de extração de DNA, utilizando-se o kit QUIAGEN e, em seguida, foi realizada uma reação de PCR em tempo real e uma de PCR convencional, sendo comparada a sensibilidade analítica de ambas as técnicas. Com base nos resultados, concluiu-se que o protocolo da PCR convencional pode ser aplicado com segurança no diagnóstico da LTI no Brasil, assim como a PCR em tempo real. Para o isolamento viral, dois pesquisadores utilizaram a cultura primária de células de rim de galinha SPF, de três semanas de idade, para observação do efeito citopático característico do vírus e ovos embrionados de galinha SPF de 9-11 dias, inoculados por via membrana corioalantoide (MCA). Os ovos foram incubados e examinados diariamente, para observação do espessamento e formação de lesões tipo *pocks*, na MCA.

¹Instituto Biológico, Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio Avícola, Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Bastos
Av. Gaspar Ricardo, 1700, CEP 17690-000, Bastos, SP, Brasil.
E-mail: nilcemarias@gmail.com

²Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, São Paulo, SP, Brasil.

³Instituto Biológico, Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio Avícola, Descalvado, SP, Brasil.

Detecção e caracterização do vírus de laringotraqueite infecciosa em um surto em aves de postura no Estado de São Paulo, Brasil*

Detection and characterization of infectious laryngotracheitis virus in an outbreak in laying hens from the state of São Paulo, Brazil

Luciano, R.L.¹; Buim, M.R.²; Del Fava, C.³; Ikuno, A.A.³; Harakava, R.⁴; Ishizuka, M.M.⁵; Buchala, F.G.⁶; Ferreira, A.J.P.⁷; Soares, N.M.²

Laringotraqueite infecciosa das aves (LTI) é uma doença respiratória aguda e altamente contagiosa, causada pelo *Herpesviridae*, *Gallid herpesvirus 1*. Essa enfermidade é responsável por um alto nível de mortalidade e redução na produtividade, em condições de campo. O objetivo deste trabalho foi descrever a caracterização molecular do vírus LTI, envolvido em um surto que ocorreu em aves de postura em Guataporá, Estado de São Paulo, Brasil. Em dezembro de 2009, ocorreu uma doença respiratória aguda, com a presença de muco hemorrágico na traqueia, no final do inverno e início da primavera de 2010, o qual foi reportado ao Serviço Estadual de Saúde Animal. Dezenove pools de amostras (três cabeças/pool) provenientes de oito lotes com sintomas clínicos e suspeita epidemiológica de LTI foram coletados. Essas amostras foram analisadas por histopatologia e PCR convencional. De 19 lotes estudados, a análise histopatológica revelou a presença de células sinciciais com corpúsculos de inclusão no epitélio traqueal em 57,9% (11/19) das amostras. A presença do vírus foi demonstrada por técnicas moleculares: PCR convencional

e sequenciamento parcial do gene ICP4 (688 bp). Treze amostras de campo foram positivas no PCR (68,4%). Dessas, nove (69,2%) foram confirmadas pela histopatologia. Adicionalmente, o DNA das 13 amostras de campo foi sequenciado, revelando uma deleção de nove nucleotídeos (nt) na posição 734-742 e uma inserção de 12 nt (posição 271-283) na sequência viral. Esse perfil foi diferente das amostras disponíveis no GenBank (número de acesso EU104909) e das duas vacinas comerciais: CEO Nobilis-ILT/Intervet (número de acesso FJ477351) e TCO LTI-IVAX/Schering-Plough (número de acesso FJ477349). A associação da histopatologia e das análises moleculares foi importante para o diagnóstico agudo e crônico da LTI nos lotes estudados. O PCR foi altamente sensível na detecção do vírus da LTI, enquanto a histopatologia foi específica na identificação das lesões características desse agente. A estirpe viral encontrada em Guataporá foi geneticamente diferente das vacinas comerciais e outras amostras de campo detectadas em outros surtos no Brasil. Esses resultados são importantes ferramentas laboratoriais para o diagnóstico da LTI, servindo como base para a adoção de medidas de controle por parte do programa oficial de sanidade avícola.

*Suporte financeiro: CNPq (Processo N° 578354/2008-0).

¹Instituto Biológico, Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio Avícola, Rua Bezerra Paes, 2278, CEP 13690-000, Descalvado, SP, Brasil.
E-mail: rluciano@biologico.sp.gov.br

²Instituto Biológico, Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio Avícola, Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Bastos, Bastos, SP, Brasil.

³Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, São Paulo, SP, Brasil.

⁴Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal, São Paulo, SP, Brasil.

⁵Comitê Estadual de Sanidade Avícola, São Paulo, SP, Brasil. ⁶Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo, Campinas, SP, Brasil.

⁷Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Patologia, São Paulo, SP, Brasil.

Caracterização de um modelo murino para avaliação clínica e anatomopatológica de camundongos experimentalmente infectados com o vírus da encefalite de Saint Louis

Characterization of a murine model for clinical and pathological evaluation of mice experimentally infected with the Saint Louis encephalitis virus

Costa, E.A.^{1*}; Rosa, R.¹; Oliveira, T.S.²; Furtini, R.²; Paixão, T.A.³; Santos, R.L.¹

O recente isolamento do vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV) em um equino que apresentou sinais neurológicos no Estado de Minas Gerais objetivou a necessidade da caracterização *in vivo* desse arbovírus no País, visto seu amplo potencial epidêmico e epizootico. Estoques virais foram produzidos por inoculação do homogeneizado do tecido cerebral do equino infectado pelo SLEV em células de mosquito da linhagem C6/36. Sete grupos de seis camundongos suíços neonatos foram infectados via intracerebral (ic) com o estoque viral a uma concentração de 1.0×10^3 FFU C6/36/ $4 \mu\text{L}$ /camundongo. Os tecidos cerebrais dos animais que vieram a óbito ou que foram sacrificados sete dias pós-infecção (dpi) foram homogeneizados (pool), clarificados, filtrados e utilizados como inóculo para o segundo grupo de camundongos (P2) e assim sucessivamente

até a sétima passagem (P7). A suspensão 10% resultante por passagem foi utilizada para a detecção do RNA viral por transcrição reversa seguida de PCR (RT-PCR). O SNC e os órgãos de dois animais por passagem foram fixados em formol tamponado a 10%, processados segundo a técnica de inclusão em parafina e corados com hematoxilina e eosina. Alterações vasculares como hipermia e hemorragia foram visualizadas no SNC durante a terceira passagem (P3) em cérebros de camundongos, assim como alterações circulatórias sistêmicas caracterizadas por edema subcutâneo de membros e necrose de extremidades. A partir da quarta passagem (P4), alterações comportamentais, variando de hiperexcitabilidade à apatia, começaram a ser observadas com progressiva evolução até a evidência de sinais neurológicos, identificados por andar em círculos e perda da propriocepção dos animais. Evidente tendência à hemorragia ocorreu a partir da quinta passagem, com ocorrência de hemoperitônio e hematomas subcutâneos, associados ao diagnóstico histológico de hemorragia multifocal acentuada em fígado, coração, rim e pulmão. Durante o estudo, a mortalidade dos camundongos infectados se deu entre o 2º e 3º dpi, chegando a 100% na última passagem (P7). O grupo controle, inoculado com PBS 10%, não apresentou qualquer alteração clínica, macroscópica ou histológica significativa. Amostras de SNC e pool dos órgãos que apresentaram alterações vasculares foram positivas pela RT-PCR específica para SLEV. No presente estudo, manifestações hemorrágicas sistêmicas, característica de outros flavivírus, como o vírus da dengue, foram observadas nos camundongos inoculados com o SLEV. Sinais hemorrágicos associados ao SLEV foram descritos pela primeira vez, no Brasil, durante um surto de Dengue sorotipo 3, em humanos. O processo de adaptação do SLEV em modelo murino permitiu a caracterização da cepa isolada, pela primeira vez no Brasil, a partir do SNC de um equino e confirmou que, além de ser potencialmente neurovirulenta, causando encefalopatia, também está associada a quadros de vasculopatia sistêmica.

*Bolsista DTI-1 do Edital CNPq/Mapa/SDA No 064/2008, projeto 578385/2008-2.

¹Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Av. Antônio Carlos, 6627, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil.
E-mail: rsantos@vet.ufmg.br

²Instituto Mineiro de Agropecuária, Belo Horizonte, MG, Brasil. ³Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, MG, Brasil.

Diagnóstico epidemiológico e medidas de controle adotadas pelo serviço oficial em um surto de laringotraqueíte infecciosa das aves (LTI) no Estado de São Paulo, Brasil

Epidemiological diagnosis and control measures adopted by the official service in an outbreak of Infections Laryngotracheitis (ILT) of poultry

Buchala, F.G.¹; Ishizuka, M.M.^{2*}; Leite, L.O.¹; Dal Farra M.C.T.¹; Ferreira, J.P.³

A LTI, doença de ocorrência esporádica no Brasil, foi diagnosticada em 2003 com o primeiro caso em aves de postura de ovos comerciais na região de Bastos, Estado de São Paulo (SP), principal região de produção de ovos do país. Um programa de controle foi implantado com a criação de um bolsão (zona de proteção + zona de vigilância), com interdição das propriedades, proibição do trânsito de aves de descarte e dejetos, medidas de biossegurança e introdução de um programa oficial de vacinação massal com uso de vacinas vivas. O último caso foi observado em maio de 2004 e a doença foi considerada

controlada na região. Em 2008, novos casos foram notificados nos Estados do Rio Grande do Sul, Paraná e Distrito Federal e controlados sem uso de vacinas, sendo as principais medidas a interdição das propriedades, abate sanitário das aves, limpeza, desinfecção e vazio sanitário. Este trabalho tem por objetivo reunir ferramentas do diagnóstico epidemiológico (sistema de vigilância passiva com a notificação de ocorrência de doenças, formulários e questionários de investigação epidemiológica, indicadores de saúde, indicadores de produtividade), sinais clínicos de doença respiratória, achados anatomopatológicos, monitoramento sanitário com a utilização de critérios de amostragem, uso das diferentes técnicas para o diagnóstico laboratorial (sorologia ELISA e IDGA, histopatologia, PCR e isolamento). Os resultados obtidos pelas diferentes ferramentas epidemiológicas proporcionaram aos médicos veterinários do SVO de SP a interpretação e obtenção de amplo diagnóstico de situação, com o conhecimento da prevalência (infecção/doença), distribuição geográfica e impacto econômico, que proporcionaram o estabelecimento de medidas compulsórias de profilaxia: delimitação de zona infectada, interdição das propriedades, desinfecção dos veículos, controle do trânsito de aves e ovos, abate sanitário em dois lotes do foco índice, compostagem, proibição da muda forçada, uso de TCO vacinas, vigilâncias ativa e passiva. A doença está controlada com vacinação. A base legal foi constituída pela Portaria CDA nº 6 de 02/11/2011 (estabelece as medidas de profilaxia inespecíficas e específicas para o controle da laringotraqueíte infecciosa das aves, a serem cumpridas pelos estabelecimentos avícolas de postura de ovos comerciais localizados no município de Guataporã e dá outras providências) e Resolução SAA nº58 de 12/14/2010 (estabelece as medidas de profilaxia inespecíficas e específicas para o controle da laringotraqueíte infecciosa das aves, a serem cumpridas pelos estabelecimentos avícolas de produção de ovos comerciais, localizados no município de Guataporã e dá outras providências).

*Comitê de Sanidade Avícola de São Paulo.

¹Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo, Av. Brasil, 2340, CEP 13070-178, Campinas, SP, Brasil. ²Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, SP, Brasil.

Encefalites equinas em Minas Gerais e o primeiro isolamento do vírus da encefalite de Saint Louis no Brasil

Equine Encephalitis in Minas Gerais State and the first isolation of Saint Louis Encephalitis virus in Brazil

Costa, E.A.^{1*}; Rosa, R.¹; Oliveira, T.S.²; Furtini, R.²; Paixão, T.A.³; Santos, R.L.¹

Em Minas Gerais, o Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) é o órgão responsável pela execução dos programas sanitários do Mapa. Anualmente, o Laboratório de Saúde Animal do IMA (LSA/IMA) recebe aproximadamente cem amostras de sistema nervoso central de equídeos com sinais neurológicos. Cerca de 36% dessas amostras são positivas para raiva. Logo, grande parte dos casos necessita de diagnóstico diferencial. Em 2004, o LSA/IMA implantou o diagnóstico histopatológico das enfermidades neurológicas. Com isso, outras enfermidades puderam ser diagnosticadas em amostras negativas para raiva. Porém, testes mais específicos ainda são necessários para aumentar a acurácia do diagnóstico e permitir a identificação do agente etiológico envolvido. De janeiro de 2009 a janeiro de 2011, um levantamento dos casos de encefalite e encefalomielite em equinos no Estado de Minas Gerais foi realizado em